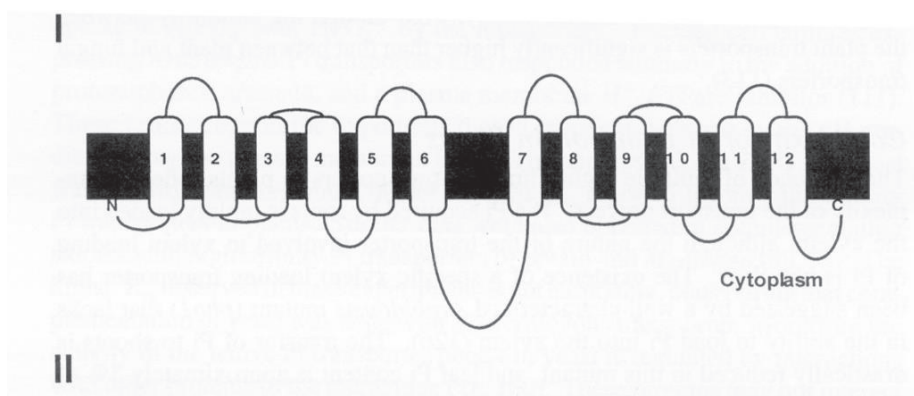


Isolamento e Caracterização de Genes Transportadores de Fósforo de Alta Afinidade em Sorgo



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
189**

**Isolamento e Caracterização de
Genes Transportadores de Fósforo
de Alta Afinidade em Sorgo**

Maria José Vilaça de Vasconcelos
José Edson Fontes Figueiredo
Robert Eugene Schaffert
Kaschandra G Raghothama

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2019*

Esta publicação está disponível no endereço:

<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sa

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia
Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia
Ferreira Simeone, Roberto dos Santos
Trindade e Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Tânia Mara Assunção Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto da capa
KG Raghothama

1ª edição
Publicação digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Isolamento e caracterização de genes transportadores de fósforo de alta afinidade
em sorgo / Maria José Vilaça de Vasconcelos ... [et al.]. – Sete Lagoas :
Embrapa Milho e Sorgo, 2019.
21 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo,
ISSN 1679-0154; 189).

1. Melhoramento genético. 2. Gene. 3. Marcador genético. 4. *Sorghum
bicolor*. I. Vasconcelos, Maria José Vilaça de. II. Figueiredo, José Edson Fontes.
III. Schaffert, Robert Eugene. IV. Raghothama, Kaschandra G. V. Título. VI. Série.

CDD 631.52 (21. ed.)

Sumário

Resumo04

Abstract05

Introdução.....06

Material e Métodos08

Resultados e Discussão10

Conclusões.....14

Referências15

Isolamento e Caracterização de Genes Transportadores de Fósforo de Alta Afinidade em Sorgo

Maria José Vilaça de Vasconcelos¹

José Edson Fontes Figueiredo²

Robert Eugene Schaffert³

Kaschandra G Raghothama⁴

Resumo – O fosfato (Pi) é um dos macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. No entanto, sua disponibilidade é altamente restrita em solos ácidos do Cerrado brasileiro, que são frequentemente usados para o cultivo de sorgo (*Sorghum bicolor*). Embora vários genótipos contrastantes eficientes e ineficientes do uso de Pi tenham sido obtidos de variantes genéticas naturais, os mecanismos moleculares subjacentes permanecem obscuros. Os transportadores Pi de alta afinidade desempenham um papel fundamental na aquisição de Pi pelas raízes e sua posterior mobilização para partes aéreas. Neste estudo, preparamos uma biblioteca de cDNA a partir de plântulas de sorgo crescidas sob deficiência de Pi que foi escrutinada utilizando-se os transportadores heterólogos de Pi, ZmPTs do milho. Isso possibilitou o isolamento de dois homólogos referidos como SbPT1 (MH333040) e SbPT2 (MH333041) (*Sorghum bicolor* Phosphate Transporter). A análise de Southern blot revelou que os genes SbPT estão representados por uma pequena família gênica compreendendo cinco a seis membros no genoma do sorgo. Os resultados evidenciaram um aumento significativo nos níveis de transcrição de SbPT1 e SbPT2 nas raízes de genótipos deficientes em Pi. Esses resultados sugerem a regulação transcricional de SbPTs por Pi.

Termos para indexação: SbPTs; *Sorghum bicolor*; biblioteca de cDNA, Southern e Northern Blots.

¹ Farmacêutica – Bioquímica, PhD., Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

² Biólogo, D.Sc. em Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

³ Eng.-Agrôn., Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

⁴ Eng.-Agrôn., Professor da Universidade de Purdue, IN, USA.

Isolation and Characterization of High Affinity Phosphorus Transporter Genes in Sorghum

Abstract – Phosphate (Pi) is one essential macronutrient required for plant growth and development. However, its availability is highly restricted in acidic soils of the Brazilian Cerrado, which is frequently used for sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivation. Although several efficient and inefficient contrasting genotypes phosphorus *use efficiency* have been obtained from natural genetic variants, their underlying molecular mechanism remains obscure. High affinity Pi transporters play a key role in Pi acquisition by the roots and its subsequent mobilization to aerial parts. In this study, we prepared a cDNA library from sorghum seedlings grown under Pi deficiency that was scrutinized using the *maize* heterologous ZmPTs Pi transports. This led to the isolation of two homologues referred as SbPT1 (MH333040) and SbPT2 (MH333041) (*Sorghum bicolor* Phosphate Transporter). Southern blot analysis revealed that the SbPT genes comprise a small family of genes with five to six members in the sorghum genome. Results showed a significant increase in the transcription levels of SbPT1 and SbPT2 in the roots of Pi-deficient plants. These results suggest the transcriptional regulation of SbPTs by Pi.

Index terms: SbPT; *Sorghum bicolor*; cDNA Library; Southern and Northern Blots.

Introdução

A disponibilidade de fosfato é fundamental para o crescimento e desenvolvimento ideal das plantas. Fósforo é um constituinte de várias moléculas biologicamente importantes, tais como ácidos nucleicos, ATP, fosfolipídios, e também serve como um metabólito envolvido em um amplo espectro de processos biológicos, incluindo metabolismo de carbono, fotossíntese e reações de transferência de energia (Raghothama; Karthikeyan, 2005; Jain et al., 2007; Schachtman; Shin, 2007). O fosfato é um dos nutrientes vegetais mais limitantes em muitas regiões do mundo, particularmente nas tropicais. As culturas são cultivadas em vastas extensões de solos severamente deficientes em Pi na América Latina (Yan et al., 1996).

A área de Cerrado no Brasil central ocupa cerca de dois milhões de quilômetros quadrados, o que representa 23% da superfície terrestre do País. Os solos de Cerrado são altamente ácidos e caracterizam-se por níveis tóxicos de Al e alta adsorção de P, tornando a disponibilidade de Pi, um dos principais problemas de limitação de rendimento para espécies cultivadas nessa região (Schaffert et al., 2001). Em práticas agrícolas convencionais, a deficiência de Pi é largamente alterada pela aplicação de fertilizantes fosfatados. No entanto, esta prática além de ser cara tem o seu uso continuado ameaçado em razão das reservas cada vez menores de rochas não renováveis de fosfatos (Abelson, 1999). Há também evidências crescentes de que os fertilizantes por si só não podem sustentar os rendimentos das culturas por longos períodos (Tilman et al., 2002). Na cultura de arroz, onde duas ou três safras crescem anualmente, o uso de fertilizantes aumentou com o tempo, mas os rendimentos muitas vezes permaneceram inalterados (Cassman; Pingali, 1995). Isto sugeriu que há necessidade de melhorar a eficiência do uso de fósforo pelas culturas.

Uma das maneiras possíveis de resolver este grave problema é identificar ou desenvolver genótipos de espécies de culturas que sejam eficientes na aquisição e utilização do fósforo. Variações inter e intraespecíficas na capacidade de desenvolvimento das plantas em condições limitantes de fósforo também foram relatadas anteriormente para várias espécies agrônômicas (Lynch; Beebe, 1995; Lynch, 1998). Essas variações estão amplamente correlacionadas a um aumento no comprimento e na densidade dos pelos radiculares, facilitando a exploração do volume do solo pelas

raízes (Bates; Lynch, 2001; Lynch; Brown, 2001; Gahoonia et al., 2001; Wang et al., 2004). A formação de aerênquima cortical induzida por baixa disponibilidade de fósforo em raízes de plantas de feijão eficientes no uso de fósforo também tem sido atribuída à adaptação de plantas às condições de baixa disponibilidade desse elemento (Fan et al., 2003). Concomitantemente, esforços têm sido direcionados para a elucidação dos mecanismos moleculares subjacentes que governam diferenças genotípicas na absorção de P em solos com deficiência de P. Um mapeamento QTL da população de arroz, desenvolvido a partir de um cruzamento entre a cultivar Kasakath (alta absorção de P) com a cultivar Japonica Nipponbare (baixa absorção de P), revelou que cerca de 80% da variação entre os genótipos se deve a um único QTL que é referido como Pup1 (Wissuwa et al., 1998, 2002; Wissuwa; Ae, 2001; Gahoonia; Nielsen, 2004; Gamuyao et al., 2012).

A análise assimétrica da expressão gênica utilizando fragmentos de genes da planta *Arabidopsis* revelou indução de transportadores de Pi de alta afinidade juntamente com uma série de genes que se presumia estarem associados às respostas de plantas à deficiência de Pi (Misson et al., 2005). Embora vários estudos tenham fornecido informações abrangentes sobre as respostas moleculares à deficiência de P em plantas modelos (Jain et al., 2007; Schachtman; Shin, 2007; Nussaume et al., 2011; Huang et al., 2013), não está claro qual das características moleculares confere variabilidade genotípica para tolerância ao estresse de fósforo. Uma evidência para a variabilidade genotípica poderia ser que alguns dos genótipos eficientes no uso de P podem ter desenvolvido uma coordenação mais eficiente da absorção de P através de transportadores fosfatos de alta afinidade pertencentes à família Pht1 e sua utilização. Mostrou-se a expressão de genes transportadores de P de alta afinidade nas interfaces simbióticas raiz-solo e fungos micorrízicos de várias plantas di e monocotiledóneas (Misson et al., 2004; Raghothama; Karthikeyan, 2005; Nagy et al., 2006; Jain et al., 2007; Schachtman; Shin, 2007). Reduções significativas de 40% a 75% da capacidade de absorção de P foram demonstradas nos transportadores Pi de alta afinidade (Misson et al., 2004; Shin et al., 2004). Um estudo anterior também mostrou o aumento na captação e concentração de fosfato em células de tabaco transgênicas expressando o transportador de fosfato de *Arabidopsis* (Mitsukawa et al., 1997). Além disso, a fusão do gene promotor-repórter e RT-PCR confirmaram a expressão de transportadores Pi de alta afinidade não apenas em raízes,

mas também em diferentes tecidos vegetativos e reprodutivos, destacando seu envolvimento tanto na aquisição do Pi quanto na mobilização interna (Karthikeyan et al., 2002; Mudge et al., 2002). A expressão diferencial de transportadores Pi de alta afinidade em diferentes genótipos de trigo (Davies et al., 2002; Mushtak et al., 2018) e arroz (Zhang et al., 2015; Wu et al., 2013; Yang et al., 2018), durante o estresse de P, forneceu evidências adicionais para o provável envolvimento de transportadores Pi de alta afinidade em conferir variabilidade genotípica para eficiência de uso de Pi.

Materiais e Métodos

Sementes de genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (Moench)) foram germinadas em papel de germinação e transferidas para bandejas contendo solução nutritiva de Hoagland (meia força) modificada, por uma semana (Liu et al., 1998). Após uma semana, as plantas foram então transferidas para solução nutritiva de Hoagland sem fósforo. Durante o curso dos tratamentos, as soluções nutritivas foram renovadas em dias alternados. Após 15 dias de tratamento, as raízes das plantas foram colhidas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para extração de RNA e DNA visando a construção da biblioteca de cDNA, análise de Southern e Northern blot.

Biblioteca de cDNA

O RNA total foi isolado das raízes do genótipo de sorgo usando o método de precipitação com fenol e cloreto de lítio (Pawlowski et al., 1994) e o mRNA foi obtido utilizando o kit de mRNA PolyATtract® (Promega Corporation, Madison, WI). A qualidade do mRNA foi determinada em gel de agarose desnaturante, e subsequentemente cinco microgramas da amostra foram usadas para o preparo da biblioteca de cDNA. A biblioteca de cDNA foi construída no sítio *EcoRI-XhoI* do vetor Uni-ZAP XR de acordo com as instruções do fabricante (Stratagene, CA) e, em seguida, escrutinada utilizando-se transportadores Pi de alta afinidade de milho marcados com P^{32} de acordo com procedimento padrão (Sambrook et al., 1989; Nagy et al., 2006). Com base no tamanho da inserção e no mapeamento de restrição, os clones representativos foram sequenciados.

RACE-PCR - Foi feita amplificação rápida de extremidades de cDNA para obter clones de comprimento total. Foi empregada a técnica 5'-RACE-PCR usando a primeira cadeia de DNA de sorgo como molde e a reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Stratagene, CA). Os produtos de RACE-PCR foram clonados utilizando um kit de clonagem TOPO-TA e *E. coli* TOP10F quimicamente competente (Invitrogene, CA) e realizado o sequenciamento. Os dois clones isolados foram denominados como SbPT1 e SbPT2.

Depósito das sequências

As sequências clonadas dos transportadores de fósforo de sorgo e expressos em raízes de sorgo submetidas à deficiência desse elemento foram depositadas no GeneBank em 11/05/2018, sob o Código: MH333040 (**SbPT1**) e MH333041 (**SBPT2**).

Southern blot

O DNA genômico foi extraído das folhas dos genótipos de sorgo como descrito por Dellaporta et al. (1983). Vinte microgramas de DNA genômico foram digeridos com *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III e separados em gel de agarose a 1% (p/v) por electroforese. Em seguida, o DNA foi transferido para membranas de nylon como descrito (Sambrook et al., 1989) e hibridizado com as sondas de cDNA marcadas com P³² de SbPT1 e SbPT2. Os filtros foram inicialmente lavados duas vezes, dez minutos cada, com uma solução de baixa estrigência 2X SSC e 0,2% de SDS (v / v). Seguiu-se lavagem de alta estrigência com 0,1X SSC e SDS a 0,1% (v / v) a 42 °C durante 10 minutos. Membranas foram expostas a filmes Kodak XAR-5. Os filmes foram revelados e estudados.

Northern Blot

O RNA total foi extraído usando o método de precipitação com fenol e cloreto de lítio (Pawlowski et al., 1994). Dez microgramas de RNA total foram separados por electroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2% (p / v) e transferidos para uma membrana de nylon (MAGNA Osmonics Inc.,

Minnetonka, MN), seguindo as instruções de fabricante. Após a transferência, o RNA foi imobilizado por UV em Stratalinker (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). A pré-hibridação foi realizada por 2 a 4 horas a 42 °C em solução contendo formamida 50% (v / v), solução 5X Denhardt, SDS 0,1% (w / v) e SSPE 6X e 150 µg / mL DNA de esperma de salmão. Utilizou-se fragmentos de DNA marcados com ³²P-dCTP utilizando o kit de marcação de DNA II™ DECA prime (Ambion, Austin, TX) para sondar as membranas. A hibridização foi realizada com 10⁶ cpm de sonda / mL num tampão de hibridação a 42 °C durante 16 horas. As condições de lavagem e exposição ao filme de raio X foram semelhantes às descritas anteriormente para o Southern blot.

Resultados e Discussão

Neste estudo, foram isolados e caracterizados os genes SbPT1 e SbPT2 que codificam para transportadores Pi de alta afinidade, usando uma biblioteca de cDNA preparada a partir de raízes P(-) de sorgo (Figura 1). As sequências de aminoácidos dos transportadores de Pi do sorgo revelaram alta homologia com transportadores de Pi de milho, cevada e arroz (Tabela 1) e são membros da família de genes Pht1 (Paszkowski et al., 2002; Rae et al., 2003; Nagy et al., 2006). Isso é consistente com estudos anteriores que relataram similaridade de sequência entre os membros das famílias de transportadores Pi de uma variedade de espécies de plantas (Raghothama, 1999).

Estudos moleculares mostraram a expressão desses transportadores em diferente genótipos de sorgo crescidos em solução nutritiva na presença e ausência de Pi (Figura 2). As análise espaço-temporal e o estudo do reabastecimento revelaram a regulação transcricional de SbPTs nas raízes, caule e folhas de genótipos de sorgo submetidos ao estresse de fósforo (Dados não mostrados). Esses resultados estão de acordo com relatos anteriores que demonstraram que os transportadores Pi de alta afinidade em diferentes espécies de plantas são rigidamente regulados por Pi (Muchhal et al., 1996; Daram et al., 1998; Liu et al., 1998; Muchhal; Raghothama, 1999; Karthikeyan et al., 2002; Bustos et al., 2010). Se os SbPTs operam coletiva ou independentemente na manutenção da homeostase de Pi é atualmente uma questão meramente especulativa. Algumas evidências foram geradas pelo estudo de *Medicago truncatula* que sugeriram que o MtPT1, um transportador da família Pht1, forma estruturas de ordem superior, dímeros ou tetrâmeros

potenciais, e a perda de uma proteína transportadora Pi poderia afetar a atividade de todo o complexo transportador (Chiou et al., 2001). Uma tendência semelhante também foi observada para os transportadores de sacarose, localizados nos *elementos* do tubo crivado, que formam complexos oligoméricos em razão da capacidade de interagirem uns com os outros (Reinders et al., 2002). Uma análise mais abrangente da função de diferentes membros da família Pht1 foi fornecida pelo estudo de um mutante duplo que não possuía Pht1;1 e Pht1;4 em *Arabidopsis thaliana* (Shin et al., 2004). Sob condições de baixa concentração de Pi, o duplo mutante de pht1;1 e pht1;4 apresentou redução de cerca de 75% na capacidade de captação de Pi em relação ao tipo selvagem. Isto sugere que a alta eficiência de aquisição de Pi dos transportadores de Pi poderia possivelmente estar relacionada com a abundância dos transcritos do gene que os codificam. Além disso, a concentração de Pi no xilema pode ser tão alta quanto 10 mM, e presume-se que Pi é carregado no xilema por um sistema ativo de transporte (Bielecki; Ferguson, 1983; Bielecka et al., 2015; Poirier et al., 1991). Atualmente, a presença de transportadores de Pi que poderiam desempenhar um papel na remobilização de Pi tem sido amplamente inferida a partir da expressão espacial de genes que codificam esses transportadores em diferentes espécies de plantas (Devaiah et al., 2009; Daram et al., 1998; Chiou et al., 2001; Mudge et al., 2002). Foi demonstrado que quase 80% do Pi é remobilizado de folhas senescentes em *Arabidopsis thaliana* (Himelblau; Amasino, 2001) e isso pode ser corroborado por um relato que mostrou uma forte expressão do gene repórter dirigido por promotor Pht1 em folhas senescentes de plantas famintas por Pi (Karthikeyan et al., 2002). Em nosso estudo, SbPT1 e SbPT2 também mostraram altos níveis de transcritos nas folhas jovens e velhas durante o estresse de Pi (dados não mostrados), indicando seu papel no movimento e remobilização de Pi através de uma variedade de outros tecidos, incluindo o vascular. Isso evidencia o potencial dos transportadores de Pi na remobilização em diferentes tecidos e consequente utilização de Pi. Diferenças no padrão de expressão dos transportadores de Pi também foram relatadas em variedades de trigo (Davies et al., 2002) e arroz (Jia et al., 2011; Sun et al., 2012; Secco et al., 2013; Wang et al., 2014; Li et al., 2015).

Para mais informações sobre o papel dos SbPTs na contribuição para a eficiência do genótipo do sorgo, esforços estão em andamento na Embrapa

para desenvolver linhas quase isogênicas (NILs) a partir de um cruzamento entre genótipos eficiente e ineficiente.

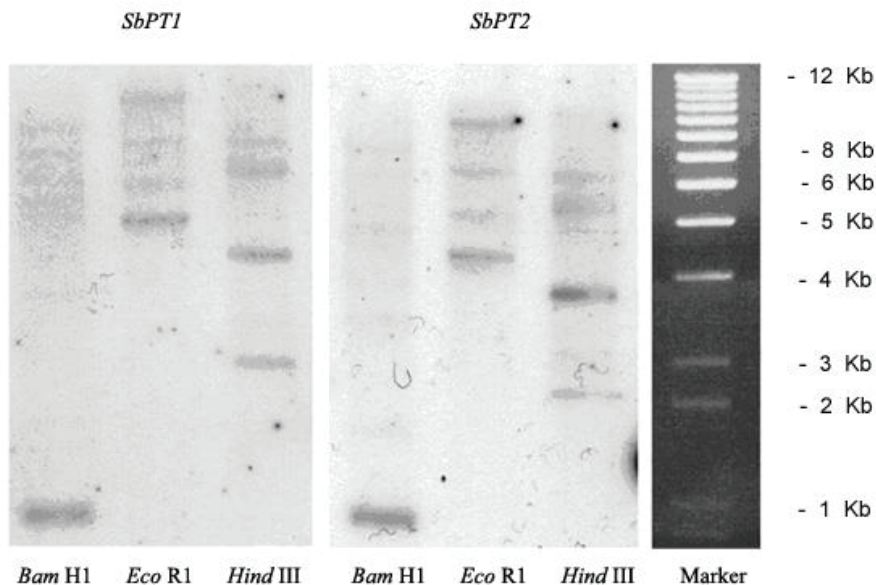


Figura 1. Análise de Southern blot dos genes *SbPT1* e *SbPT2* de sorgo. O DNA genômico do sorgo foi digerido com *Bam*H1, *Eco*R1 e *Hind*III e sondado com *SbPT1* e *SbPT2* marcados com ^{32}P . A escada do DNA foi usada como marcador de tamanho.

Tabelas 1A, 1B e 1C. Percentual de Homologia de SbPTs (transportadores de fosfato em *Sorghum bicolor*) com transportadores de P de milho (A), cevada (B) e arroz (C). A homologia foi determinada utilizando o programa FASTA (pacote GCG, Madison, WI), e as sequências proteicas foram recuperadas no formato FASTA utilizando BLAST.

A

Transportadores de fosfato em milho (ZmPTs)						
	ZmPT1	ZmPT2	ZmPT3	ZmPT4	ZmPT5	ZmPT6
SbPT1	87 %	87 %	72 %	85 %	60 %	72 %
SbPT2	86 %	86 %	78 %	83 %	60 %	73 %

B

Transportadores de fosfato em cevada (HvPTs)						
	HvPT1	HvPT2	HvPT4	HvPT5	HvPT6	HvPT7
SbPT1	76 %	76 %	84 %	80 %	78 %	78 %
SbPT2	75 %	75 %	83 %	81 %	77 %	75 %

C

Transportadores de fosfato em arroz (OsPTs)												
	OsPT1	OsPT2	OsPT3	OsPT4	OsPT5	OsPT6	OsPT7	OsPT8	OsPT9	OsPT10	OsPT11	OsPT12
SbPT1	78 %	77 %	78 %	80 %	78 %	78 %	77 %	86 %	59 %	59 %	59 %	80 %
SbPT2	77 %	75 %	76 %	80 %	78 %	78 %	76 %	85 %	59 %	60 %	60 %	80 %

OsPT13

61 %

65 %

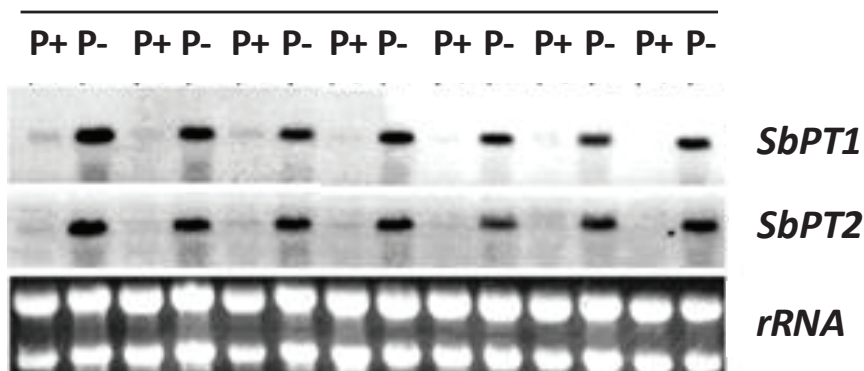


Figura 2. Expressão dos SbPTs induzida por deficiência de fósforo em genótipos de sorgo. Análise de Northern blot das raízes de genótipos de sorgo cultivados hidroponicamente sob condições P + (250 μ M) e P- (0 μ M) por 15 dias. Os blots foram hibridados com SbPT1 e SbPT2 marcados com 32 P. A equivalência da quantidade de RNA em todas as linhas é mostrada por rRNA corado com brometo de etídio (painel inferior).

Conclusões

Os genes SbPTs podem ser usado como marcador molecular para mapeamento de ligação e análise de QTL da eficiência do uso de Pi. Além disso, atualmente a técnica de supressão de hibridação subtrativa (SSH) está sendo utilizada para a identificação de outros marcadores moleculares de sorgo que são expressos apenas em populações eficientes no uso de Pi.

Referências

- ABELSON, P. H. A potential phosphate crisis. **Science**, v. 283, n. 5410, p. 2015, 1999.
- BATES, R. T.; LYNCH, J. P. Roots hairs confer a competitive advantage under low phosphorus availability. **Plant and Soil**, v. 236, n. 2, p. 243-250, 2001.
- BIELECKA, M.; WATANABE, M.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W. R.; HAWKESFORD, M. J.; HESSE, H.; HOEFGEN, R. Transcriptome and metabolome analysis of plant sulfate starvation and resupply provides novel information on transcriptional regulation of metabolism associated with sulfur, nitrogen and phosphorus nutritional responses in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, article 805, 2015.
- BIELESKI, R. L.; FERGUSON, I. B. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R. L. (Ed.). **Inorganic plant nutrition**. Heidelberg: Springer, 1983. p. 422-449. (Encyclopedia of Plant Physiology, v. 15).
- BUSTOS, R.; CASTRILLO, G.; LINHARES, F.; PUGA, M. I.; RUBIO, V.; PÉREZ-PÉREZ, J.; SOLANO, R.; LEYVA, A.; PAZ-ARES, J. A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in Arabidopsis. **PLOS Genetics**, v. 6, n. 9, e1001102, 2010.
- CASSMAN, K. G.; PINGALI, P. L. Extrapolating trends from long-term experiments to farmers fields: the case of irrigated rice systems in Asia. In: BARNETT, V.; PAYNE, R.; STEINER, R. (Ed.). **Agricultural sustainability in economic environmental and statistical terms**. London: John Wiley, 1995. p. 63-84.
- CHIOU, T. J.; LIU, H.; HARRISON, M. J. The spatial expression patterns of a phosphate transporter (*MtPt1*) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. **Plant Journal**, v. 25, n. 3, p. 281-293, 2001.
- DAVIES, T. G. E.; YING, J.; XU, Q.; LI, Z. S.; LI, J.; GORDON-WEEKS, R. Expression analysis of putative high-affinity phosphate transporters in Chinese winter wheats. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 10, p. 1325-1339, 2002.

DARAM, P.; BRUNNER, S.; PERSSON, B. L.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. **Planta**, v. 206, n. 2, p. 225-233, 1998.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.

DEVAIAH, B. N.; MADHUVANTHI, R.; KARTHIKEYAN, A. S.; RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the *MYB62* transcription factor in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v. 2, n. 1, p. 43-58, 2009.

FAN, M.; ZHU, J.; RICHARDS, C.; BROWN, K. M.; LYNCH, J. P. Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. **Functional Plant Biology**, v. 30, n. 5, p. 493-506, 2003.

GAHOONIA, T. S.; NIELSEN, N. E. Root traits as tools for creating phosphorus efficient crop varieties. **Plant and Soil**, v. 260, n. 1/2, p. 47-57, 2004.

GAHOONIA, T. S.; NIELSEN, N. E.; JOSHI, P. A.; JAHOOOR, A. A root hairless barley mutant for elucidating genetic of root hairs and phosphorus uptake. **Plant and Soil**, v. 235, n. 2, p. 211-219, 2001.

GAMUYAO, R.; CHIN, J.; PARIASCA-TANAKA, J.; PESARESI, P.; CATAUSAN, S.; DALID, C.; SLAMET-LOEDIN, I.; TECSON-MENDOZA, E. M.; WISSUWA, M.; HEUER, S. The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature**, v. 488, p. 535-539, 2012.

HIMELBLAU, E.; AMASINO, R. M. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 10, p. 1317-1323, 2001.

HUANG, T. K.; HAN, C. L.; LIN, S. I.; CHEN, Y. J.; TSAI, Y. C.; CHEN, Y. R.; CHEN, J. W.; LIN, W. Y.; CHEN, P. M.; LIU, T. Y.; CHEN, Y. S.; SUN, C. M.; CHIOU, T. J. Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in *Arabidopsis* roots. **Plant Cell**, v. 25, p. 4044-4060, 2013.

JAIN, A.; VASCONCELOS, M. J. V. de; RAGHOTHAMA, K. G.; SAHI, S. V. Molecular mechanisms of plant adaptation to phosphate deficiency. **Plant Breeding Reviews**, v. 29, p. 359-419, 2007.

JIA, H. F.; REN, H. Y.; GU, M.; ZHAO, J. N.; SUN, S. B.; ZHANG, X.; CHEN, J. Y.; WU, P.; XU, G. H. The phosphate transporter gene *OsPht1;8* is involved in phosphate homeostasis in rice. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 1164-1175, 2011.

KARTHIKEYAN, A. S.; VARADARAJAN, D. K.; MUKATIRA, U. T.; D'URZO, M. P.; DAMSZ, B.; RAGHOTHAMA, K. G. Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters. **Plant Physiology**, v. 130, p. 221-233, 2002.

LI, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; FAN, H.; GU, M.; QU, H.; XU, G. Phosphate transporter *OsPht1;8* in rice plays an important role in phosphorus redistribution from source to sink organs and allocation between embryo and endosperm of seeds. **Plant Science**, v. 230, p. 23-32, 2015.

LIU, C.; MUCHHAL, U. S.; UTHAPPA, M.; KONOWICZ, A. K.; RAGHOTHAMA, K. G. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissue by phosphorus. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 91-99, 1998.

LYNCH, J. P.; BEEBE, S. Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. **HortScience**, v. 30, n. 6, p. 1165-1171, 1995.

LYNCH, J. The role of nutrient efficient crops in modern agriculture. **Journal of Crop Production**, v. 1, n. 2, p. 241-264, 1998.

LYNCH, J. P.; BROWN, K. M. Topsoil foraging: an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. **Plant and Soil**, v. 237, n. 2, p. 225-237, 2001.

MISSION, J.; RAGHOTHAMA, K. G.; JAIN, A.; JOUHET, J.; BLOCK, M. A.; BLIGNY, R.; ORTET, P.; CREFF, A.; SOMERVILLE, S.; ROLLAND, N.; DOUMAS, P.; NACRY, P.; HERRERA-ESTRELLA, L.; NUSSAUME, L.; THIBAUD, M. C. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 33, p. 11934-11939, 2005.

MISSION, J.; THIBAUD, M. C.; BECHTOLD, N.; RAGHOTHAMA, K. G.; NUSSAUME, L. Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis Pht1;4*, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. **Plant Molecular Biology**, v. 55, n. 5, p. 727-741, 2004.

MITSUKAWA, N.; OKUMURA, S.; SHIRANO, Y.; SATO, S.; KATO, T.; HARASHIMA, S.; SHIBATA, D. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. **Proceedings of the National of Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 13, p. 7098-7102, 1997.

MUCHHAL, U. S.; RAGHOTHAMA, K. G. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. **Proceedings of the National of Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5868-5872, 1999.

MUCHHAL, U. S.; PARDO, J. M.; RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National of Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 19, p. 10519-10523, 1996.

MUDGE, S. R.; RAE, A. L.; DIATLOFF, E.; SMITH, F. W. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 31, n. 3, p. 341-353, 2002.

MUSHTAK, K.; SHUKLA, V.; MANDEEP, K.; BOUAIN, N.; CHAIWONG, N.; LACOMBE, B.; PANDEY, A. K.; ROUACHED, H. Phosphorus transport in arabidopsis and wheat: Emerging strategies to improve P pool in seeds. **Agriculture**, v. 8, n. 2, p. 27, 2018.

NAGY, R.; VASCONCELOS, M. J. V.; ZHAO, S.; McELVER, J.; BRUCE, W.; AMRHEIN, N.; RAGHOTHAMA, K. G.; BUCHER, M. Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from maize (*Zea mays* L.). **Plant Biology**, v. 8, n. 2, p. 186-197, 2006.

NUSSAUME, L.; KANNO, S.; JAVOT, H.; MARIN, E.; POCHON, N.; AYADI, A.; NAKANISHI, T. M.; THIBAUD, M. C. Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, article 83, 2011.

PASZKOWSKI, U.; KROKEN, S.; ROUX, C.; BRIGGS, S. P. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National of Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 13324-13329, 2002.

PAWLOWSKI, K.; KUNZE, R.; DE VRIES, S.; BISSELING, T. Isolation of total, poly (A) and polysomal RNA from plant tissues. In: GELVIN, S. B.; SHILPEROORT, R. A. (Ed.). **Plant molecular biology**: manual. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 1-3.

POIRIER, Y.; THOMA, S.; SOMERVILLE, C.; SCHIEFELBEIN, J. Mutant of Arabidopsis deficient in xylem loading of phosphate. **Plant Physiology**, v. 97, n. 3, p. 1087-1093, 1991.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 665-693, 1999.

RAGHOTHAMA, K. G.; KARTHIKEYAN, A. S. Phosphate acquisition. **Plant and Soil**, v. 274, n. 1, p. 37-49, 2005.

RAE, A. L.; CYBINSKI, D. H.; JARMEY, J. M.; SMITH, F. W. Characterization of two phosphate transporters from barley; evidence for diverse function and kinetic properties among members of the Pht1 family. **Plant Molecular Biology**, v. 53, n. 1/2, p. 27-36, 2003.

REINDERS, A.; SCHULZE, W.; KÜHN, C.; BARKER, L.; SCHULZ, A.; WARD, J. M.; FROMMER W. B. Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. **Plant Cell**, v. 14, n. 7, p. 1567-1577, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C.; PITTA, G. V. E.; BAHIA, A. F. C.; SANTOS, F. G. Genetic variability in sorghum for P efficiency and responsiveness. In: HORST, W. J.; SCHENK, M. K.; BURKERT, A.; CLAASSEN, N.; FLESSA, H.; FROMMER, W. B.; GOLDBACH, H.; OLFS, H. W.; ROMHELD, V.; SATTELMACHER, B.; SCHMIDHALTER, U.; SCHUBERT, S.; WIREN, N. V.; WITTENMAYER, L. (Ed.). **Plant nutrition, food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 72-73.

SECCO, D.; JABNOUNE, M.; WALKER, H.; SHOU, H.; WU, P.; POIRIER, Y.; WHELAN, J. Spatio-temporal transcript profiling of rice roots and shoots

in response to phosphate starvation and recovery. **Plant Cell**, v. 25, n. 11, p. 4285-4304, 2013.

SCHACHTMAN, D. P.; SHIN, R. Nutrient sensing and signaling: NPKS. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 47-69, 2007.

SHIN, H.; SHIN, H. S.; DEWBRE, G. R.; HARRISON, M. J. Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. **Plant Journal**, v. 39, n. 4, p. 629-642, 2004.

SUN, S. B.; GU, M.; CAO, Y.; HUANG, X. P.; ZHANG, X.; AI, P. H.; ZHAO, J. N.; FAN, X. R.; XU, G. H. A constitutive expressed phosphate transporter, OsPht1;1, modulates phosphate uptake and translocation in phosphate-replete rice. **Plant Physiology**, v. 159, n. 4, p. 1571-1581, 2012.

TILMAN, D.; CASSMAN, K. G.; MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, p. 671-677, 2002.

WANG, L.; LIAO, H.; YAN, X.; ZHUANG, B.; DONG, Y. Genetic variability for root hair traits as related to phosphorus status in soybean. **Plant and Soil**, v. 261, n. 1/2, p. 77-84, 2004.

WANG, X.; WANG, Y.; PIÑEROS, M. A.; WANG, Z.; WANG, W.; LI, C.; WU, Z.; KOCHIAN, L. V.; WU, P. Phosphate transporters OsPHT1;9 and OsPHT1;10 are involved in phosphate uptake in rice. **Plant Cell & Environment**, v. 37, n. 5, p. 1159-1170, 2014.

WISSUWA, M.; YANO, M.; AE, N. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 5/6, p. 777-783, 1998.

WISSUWA, M.; AE, N. Genotypic variation for tolerance to phosphorus deficiency in rice and the potential for its exploitation in rice improvement. **Plant Breeding**, v. 120, n. 1, p. 43-48, 2001.

WISSUWA, M.; WEGNER, J.; AE, N.; YANO, M. Substitution mapping of *Pup1*: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from phosphorus-deficient soil. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, n. 6/7, p. 890-897, 2002.

WU, P.; SHOU, H.; XU, G.; LIAN, X. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis.

Current Opinion in Plant Biology, v. 16, n. 2, p. 205-212, 2013.

YAN, X.; LYNCH, J. P.; BEEBE, S. E. Utilization of phosphorus substrates by contrasting common bean genotypes. **Crop Science**, v. 36, n. 4, p. 936-941, 1996.

YANG, W. T.; BAEK, D.; YUN, D. J.; LEE, K. S.; HONG, S. Y.; BAE, K. D.; CHUNG, Y. S.; KWON, Y. S.; KIM, D. H.; JUNG, K. H.; KIM D. H. Rice OsMYB5P improves plant phosphate acquisition by regulation of phosphate transporter. **PlosOne**, v. 13, n. 3, e0194628, 2018.

ZHANG, F.; SUN, Y.; PEI, W.; JAIN, A.; SUN, R.; CAO, Y.; WU, X.; JIANG, T.; ZHANG, L.; FAN, X.; CHEN, A.; QIRONG, S. Q.; XU, G. H.; SUN, S. B. Involvement of *OsPht1;4* in phosphate acquisition and mobilization facilitates embryo development in rice. **Plant Journal**, v. 82, n. 4, p. 556-569, 2015.



Milho e Sorgo



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

